

eine septische Reaktion, die sich z.B. einem chirurgischen Eingriff unterziehen müssen, bei dem als gefährliche Komplikation eine Sepsis befürchtet werden muss, z.B. auf dem Feld der Viszeralchirurgie, der Transplantationsmedizin und der Hochdosismotherapie in der Hämatologie/Onkologie.

Der Begriff "Sepsis" wird heute in einem engen Zusammenhang mit dem Begriff "Entzündung" verwendet. Als Entzündungen (Inflammationen) werden ganz allgemein bestimmte physiologische Reaktionen eines Organismus auf verschiedenartige äußere Einwirkungen wie z.B. Verletzungen, Verbrennungen, Allergene, Infektionen durch Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze und Viren, auf Fremdgewebe, die Abstoßungsreaktionen auslösen, oder auf bestimmte entzündungsauslösende endogene Zustände des Körpers, z.B. bei Autoimmunerkrankungen und Krebs, bezeichnet. Entzündungen können als harmlose, lokal begrenzte Reaktionen des Körpers auftreten, sind jedoch auch typische Merkmale zahlreicher ernster chronischer und akuter Erkrankungen von einzelnen Geweben, Organen, Organ- und Gewebsteilen.

Lokale Entzündungen sind dabei meist Teil der gesunden Immunreaktion des Körpers auf schädliche Einwirkungen, und damit Teil des lebenserhaltenden Abwehrmechanismus des Organismus. Wenn Entzündungen jedoch Teil einer fehlgeleiteten Reaktion des Körpers auf bestimmte endogene Vorgänge wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen sind und/oder chronischer Natur sind, oder wenn sie systemische Ausmaße erreichen, wie beim systemischen Inflammationssyndrom (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) oder bei einer auf infektiöse Ursachen zurückzuführenden schweren Sepsis, geraten die für Entzündungsreaktionen typischen physiologischen Vorgänge außer Kontrolle und werden zum eigentlichen, häufig lebensbedrohlichen Krankheitsgeschehen. Zum modernen Sepsisbegriff kann beispielsweise verwiesen werden auf die Diskussion der Sepsis-Definition in K.Reinhart et al., "Sepsis und septischer Schock" <sup>1</sup> in: Intensivmedizin, Georg Thieme Verlag,

geschehen bzw. am Entzündungsgeschehen beteiligter endogener Substanzen, d.h. spezifischer "Biomarker", ersetzt bzw. ergänzt.

Eine eingeführte, als Sepsis-Biomarker besonders geeignete endogene Substanz ist Procalcitonin. Die Bestimmung von Procalcitonin als Sepsismarker ist Gegenstand der Veröffentlichung M.Assicot, et al., "High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection", The Lancet, vol.341, No.8844, 1993, 515-518 ✓ und der Patente DE 42 27 454 C2 ✓ bzw. EP 0 656 121 B1 ✓ bzw. US 5,639,617. ✓

Die Verfügbarkeit des Sepsismarkers Procalcitonin hat der jüngeren Sepsisforschung starke Impulse gegeben, und es werden gegenwärtig intensive Anstrengungen unternommen, weitere Biomarker zu finden, die die Procalcitonin-Bestimmung ergänzen können und/oder zusätzliche Informationen für Zwecke der Feindiagnostik bzw. Differentialdiagnostik zu liefern vermögen. Ergebnisse dieser Anstrengungen finden sich in zahlreichen Patentanmeldungen der Anmelderin, und zwar in DE 198 47 690 A1 ✓ bzw. WO 00/22439 ✓ sowie in einer Reihe von noch unveröffentlichten deutschen Patentanmeldungen (DE 101 19<sup>3473</sup> 804.3 bzw. PCT/EP02/04219; DE 101 31 922.3; 3536<sup>3473 PCT</sup>

3537<sup>3635 EP</sup> DE 101 30 985.6) bzw. europäischen Patentanmeldungen (EP 3634<sup>3635 EP</sup> 01128848.7; EP 01128849.5; EP 01128850.3; EP 01128851.1; EP 3679<sup>3684 EP</sup> 01128852.9; EP 01129121.8; EP 02008840.7; und EP 3695<sup>3677 EP</sup> 02008841.5). Auf den Inhalt der genannten Patente und Patentanmeldungen wird hiermit durch ausdrückliche Bezugnahme zur Ergänzung der vorliegenden Beschreibung verwiesen.

Da die bei Entzündungen gebildeten endogenen Substanzen Teil der komplexen Reaktionskaskade des Körpers sind, sind derartige Substanzen nicht nur von diagnostischem Interesse, sondern es wird gegenwärtig auch mit erheblichem Aufwand versucht, durch Beeinflussung der Entstehung und/oder der Konzentration einzelner derartiger Substanzen therapeutisch in das Entzündungsgeschehen einzugreifen, um die zum Bei-

spiel bei Sepsis beobachtete systemische Ausbreitung der Entzündung möglichst frühzeitig zu stoppen. In diesem Sinne sind nachweislich am Entzündungsgeschehen beteiligte endogene Substanzen auch als potentielle therapeutische Targets anzusehen. Versuche, ansetzend an bestimmten Mediatoren des Entzündungsgeschehens dieses positiv therapeutisch zu beeinflussen, sind beschrieben beispielsweise in E.A.Panacek, "Anti-TNF strategies", Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung; Nr.2, 2001, 4-5; ✓ T.Calandra, et al., "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", Nature Medicine, Vol.6, No.2, 2000, 164-170; ✓ oder K.Garber, "Protein C may be sepsis solution" ✓ Nature Biotechnology, Vol.18, 2000, 917-918. Angesichts der bisherigen eher enttäuschenden Ergebnisse derartiger therapeutischer Ansätze besteht ein starkes Interesse daran, weitere möglichst entzündungs- bzw. sepsisspezifische endogene Biomoleküle zu identifizieren, die auch als therapeutische Targets neue Erfolgsaussichten für die Sepsisprävention und -behandlung eröffnen.

Es kann somit als allgemeine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bezeichnet werden, neue Maßnahmen (Verfahren, Mittel, Verwendungen) zur Sepsisprävention und -behandlung anzugeben, die sich aus dem Auffinden von bei Sepsis mit hoher Sensitivität auftretenden Biomolekülen ergeben, die eine zentraler Rolle bei der Entwicklung und im Verlauf einer Sepsis spielen.

Diese Aufgabe wird durch Verwendungen gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 und deren Ausführungsformen gemäß den Ansprüchen 4 und 5 sowie Mittel gemäß Anspruch 6 gelöst.

Die vorliegende Erfindung beruht, generell gesprochen, auf dem überraschenden experimentellen Befund, dass ein bestimmter, an sich aus anderen Zusammenhängen bekannter Antikörper- bzw. Autoantikörper-Typ mit außerordentlich großer Häufigkeit in Seren von Patienten, die später eine Sepsis

Die genannten Ganglioside und verwandte Verbindungen werden mit zahlreichen wichtigen biologischen Funktionen des menschlichen Körpers in Zusammenhang gebracht, zu denen z.B. das axonale Wachstum und die neuronale Differenzierung, Rezeptorenfunktionen und Beteiligungen an verschiedenen Immunreaktionen des Körpers sowie an der Signaltransduktion und Zell-Zell-Erkennung gehören.

Es ist seit langem bekannt, dass im menschlichen Körper in bestimmten Zusammenhängen Antikörper bzw. Autoantikörper nachgewiesen werden können, die an das Gangliosid  $G_{M1}$  binden, insbesondere dessen Kohlenhydratstrukturen, und an diesen ähnelnde ("diese simulierende") Kohlenhydratstrukturen anderer Moleküle. Die physiologische Rolle solcher Antikörper sowie ihre eventuelle Bedeutung für die klinische Diagnostik ist Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Der Nachweis von anti- $G_{M1}$ -Antikörpern wurde jedoch bisher nicht mit nachteiligen physiologischen Reaktionen korreliert, die eine Bedeutung für die Sepsisentwicklung aufweisen und die auf an sich bekannte Eigenschaften von an Asialo- $G_{M1}$  bindenden Antikörpern zurückgeführt werden können.

Der weitaus überwiegende Teil aller veröffentlichten Arbeiten befaßt sich mit der Rolle und der diagnostischen Signifikanz von Anti-Gangliosid-Antikörpern bei Neuropathien, z.B. bei immunvermittelten motorischen Neuropathien wie dem Guillain-Barré-Syndrom (Radikuloneuritis, Polyradikulitis) und dem verwandten (Miller-)Fisher-Syndrom. Auch im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung wurde bereits von einem vermehrten Auftreten von Anti- $G_{M1}$ -Autoantikörpern bei einigen Patienten berichtet. Ferner wurden sie bei einzelnen HIV-Patienten gefunden. Dass sie auch bei Krebs mit einer sehr hohen Sensitivität auftreten, ist ein noch unveröffentlichter neuer Befund der Anmelderin, der den in den Europäischen Patentanmeldungen EP 02009884.4 und EP 02009882.8 offenbarten Erfindungen zugrunde liegt. Auf die beiden letztgenannten Europäischen Patentanmeldungen und die Literaturliste zu

3722 EP  
EP 02009884.4 wird hiermit zur Ergänzung der Ausführungen in der vorliegenden Anmeldung ebenfalls ausdrücklich verwiesen.

Nachfolgend werden die Befunde, die die Grundlage für die Erfindungen in der vorliegenden Anmeldung bilden, und die sich daraus ableitenden präventiven und therapeutischen Maßnahmen noch näher erläutert.

Zur Vermeidung von ungerechtfertigt engen und einschränkenden Auslegungen der in der vorliegenden Anmeldung und den zugehörigen Ansprüchen verwendeten Begriffe sollen nachfolgend einige der wichtigsten Begriffe für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung besonders definiert werden:

"Antikörper": Dieser Begriff umfaßt, ohne zwischen verschiedenen Entstehungs- und Bildungsarten zu unterscheiden, Antikörper sowohl gegen externe Antigene als auch gegen körpereigene Strukturen, d.h. Autoantikörper, wobei letztere ggf. auch durch Antigen-Kreuzreaktionen aus Antikörpern gegen externe Antigene zu Autoantikörpern geworden sein können und ihre Bindungsfähigkeit gegen externe Antigene bewahrt haben können.

Wenn z.B. davon gesprochen wird, dass ein Antikörper "an Gangliosidstrukturen und an Gangliosidstrukturen simulierende Antigenstrukturen" bindet oder gegenüber "Gangliosiden bzw. bestimmten Gangliosiden reaktiv" ist, wobei reaktiv "im Sinne einer spezifischen Bindung reaktiv" bedeutet, soll er durch diese Definition hinreichend definiert sein, ohne dass z.B. seine spezifische Bindung auch an zusätzliche andere antigene Strukturen, oder seine praktische Bestimmung unter Verwendung von Reagenzien (zur Immobi-

Fig. 2 die Ergebnisse einer Vermessung der gleichen Seren wie in Fig. 1 auf Antikörper der IgA-Klasse, die an Monosialo-G<sub>M1</sub> binden;

Fig. 3 die Ergebnisse der Bestimmung von Antikörpern der IgG-Klasse, die an Asialo-G<sub>M1</sub> binden, in Seren von 30 Normalpersonen (Kontrollen), gegenübergestellt den Ergebnissen der Vermessung von 20 Seren von Sepsispatienten (alle Seren sind Teilkollektive der in den Figuren 1 und 2 vermessenen Seren);

Fig. 4 die Ergebnisse der Bestimmung von Antikörpern der IgA-Klasse, die an Asialo-G<sub>M1</sub> binden, in den gleichen Seren wie in Fig. 3;

Die Erfindung beruht auf bei der Anmelderin durchgeführten Vermessungen von Seren, wobei in der vorliegenden Anmeldung im wesentlichen nur das Meßprinzip und die erhaltenen Ergebnisse wiedergegeben werden. Eine ausführlichere Offenbarung der durchgeführten Messungen findet sich in der älteren, unveröffentlichten Europäischen Patentanmeldung 02009884.4 der Anmelderin und einer gleichzeitig mit der vorliegenden Anmeldung eingereichten weiteren Anmeldung der Anmelderin. Auf beide Anmeldungen wird zur Ergänzung des Offenbarungsinhalts der vorliegenden Anmeldung ausdrücklich Bezug genommen:

1. Bestimmung von an die Ganglioside AG<sub>M1</sub> und G<sub>M1</sub> bindenden (Auto-)Antikörpern vom IgG- und IgA-Typ in Seren von gesunden Normalpersonen (Kontrollen) und Sepsispatienten

Unter Verwendung von mit Gangliosiden (AG<sub>M1</sub> und G<sub>M1</sub>) beschichteten Teströhrchen (GA-CTs), deren freie Bindungsstellen mit BSA abgesättigt worden waren, wurden Reihenmessungen an Kontroll- und Testseren vorgenommen. Dabei wurden, wie in der älteren, unveröffentlichten Anmeldung der Anmelderin EP 02009884.4 sowie einer gleichzeitig mit der vor-

3772EP

fläche Asialo-G<sub>M1</sub>-Strukturen aufweisen, an die anti-AG<sub>M1</sub>-Antikörper spezifisch binden können und dadurch die NK-Zellen desaktivieren und zerstören. Das wird sogar planmäßig genutzt, indem auf dem Gebiet von Tierexperimenten, bei denen mit Versuchstieren gearbeitet wird, bei denen künstlich Tumoren erzeugt werden sollen, so gearbeitet wird, dass durch Gabe von anti-AG<sub>M1</sub>-Antikörpern in Verbindung mit einem krebserregenden Karzinogen oder einem Tumorkern die Immunabwehr des Versuchstiers ausgeschaltet wird, so dass sich der - im Tiermodell gewünschte - experimentelle Krebs entwickeln kann (Hugh F. Pross et al., Role of Natural Killer Cells in Cancer, Nat Immun 1993; 12:279-292; Lewis L. Lanier et al., Arousal and inhibition of human NK Cells, Immunological Reviews 1997, Vol. 155:145-154; Yoichi Fuji et al., IgG Antibodies to AsialoGM1 Are More Sensitive than IgM Antibodies to Kill in vivo Natural Killer Cells and Prematured Cytotoxic T Lymphocytes of Mouse Spleen, Microbiol.Immunol. Vol. 34(6), 533-542, 1990; N.Saijo et al., Analysis of Metastatic Spread and Growth of Tumor Cells in Mice with Depressed Natural Killer Activity by Anti-asialo GM1 Antibody or Anticancer Agents, J Cancer Res Clin Oncol (1984) 107: 157-163; Sonoku HABU et al., Role of Natural Killer Cells against Tumor growth in Nude Mice - A Brief Review, Tokai J Exp Clin Med., Vol.8, No.5, 6: 465-468, 1983; Lewis L. Lanier, NK Cell Receptors, Annu. Rev. Immunol. 1998, 16: 359-93; Theresa L. Whiteside et al., The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer; Current Opinion in Immunology 1995, 7:704-710; Tuomo Timonen et al., Natural killer cell-target cell interactions, Current Opinion in Cell Biology 1997, 9:667-673).

Aktive NK-Zellen spielen jedoch eine außerordentlich wichtige Rolle im Rahmen der Immunabwehr des Menschen, auch bei Sepsis bzw. schweren bakteriellen Infektionen. So beschreiben z.B. Shuiui Seki et al., in: Role of Liver NK Cells and Peritoneal Macrophages in Gamma Interferon and Interleukin-10 Production in Experimental Bacterial Peritonitis in Mice,

Infection and Immunity, Vol. 66, No. 11, 1998, 5286-5294; die wichtige Rolle von NK-Zellen für die Produktion von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Cytokinen. Sie zeigen, dass eine künstliche Ausschaltung der NK-Zellen unter experimentellem Einsatz von anti-AG<sub>M1</sub>-Antikörpern zu einer Inhibierung der Produktion des entzündungshemmenden Interferon- $\gamma$  führt. Auch die Auswirkungen von chirurgischem Stress und einer Endotoxin-induzierten Sepsis auf die NK-Zell-Aktivität wurden bereits untersucht, und zwar in: P.Toft et al., in: The effect of surgical stress and endotoxin-induced sepsis on the NK-cell activity, distribution and pulmonary clearance of YAC-1 and melanoma cells, APMIS 1999; 107:359-364. Ein möglicher Einfluss von physiologisch gebildeten Antikörpern mit NK-Zell-Reaktivität wird jedoch in keiner der genannten Arbeiten berücksichtigt.

Der wissenschaftlichen Literatur lassen sich Erkenntnisse, die das erfindungsgemäße Verfahren nahelegen könnten, nicht entnehmen. In einigen Arbeiten wurde zwar eine Bestimmung von anti-Gangliosid-Antikörpern im Zusammenhang mit schweren akuten Infektionskrankheiten beschrieben. Eine solche Infektionskrankheit ist die durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* hervorgerufene Chagas-Krankheit (vgl. D.H.Bronia et al., in: Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure, Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 93, No.4, 341-350 (1999) und die darin zitierte Literatur). In der letztgenannten Arbeit wird spekuliert, dass eine beobachtete, deutlich vorteilhafte Wirkung einer Verabreichung von exogenen Gangliosiden an mit dem Parasiten *T. cruzi* infizierte Mäuse bei diesen die Produktion von anti-Gangliosid-Antikörpern auslösen könnte, die dann mit Glycolipiden der Hülle von *T. cruzi* reagieren und dadurch den Tod des Parasiten bewirken sollen. Aufgrund der Befunde in der vorliegenden Anmeldung ist eine solche Erklärung wenig wahrscheinlich: Die im Falle der Chagas-Krankheit beobachteten anti-Gangliosid-Antikörper sind aufgrund ihrer die NK-



Zellen hemmenden Wirkung nicht, wie angenommen, ein heilungsfördernder Faktor, sondern stattdessen ein krankheitsauslösender bzw. -fördernder Faktor. Durch die Verabreichung von exogenen Gangliosiden, die als solche nicht als Antigene angesehen werden können, werden die anti-AG<sub>M1</sub>-Antikörper nämlich nicht gebildet sondern wahrscheinlich blockiert. Dadurch kann bei den Mäusen (bzw. bei Patienten) die Wirkung der NK-Zellen wiederhergestellt werden, und das Immunsystem kann der Parasiten Herr werden. Alle diesseits bekannten Arbeiten stellen keinerlei Zusammenhang zwischen anti-Asialo-G<sub>M1</sub>-Antikörpern und der Entstehung und Verschärfung einer Sepsis her und können daher das erfindungsgemäße Verfahren weder vorwegnehmen noch nahelegen.

Das gilt auch für andere Arbeiten, die zeigen, dass eine Verabreichung von exogenen Gangliosiden bzw. bestimmten Gangliosidderivaten in Versuchstiermodellen entzündungshemmend wirkt bzw. die Überlebensrate von Mäusen, denen das Bakterientoxins LPS verabreicht worden war, signifikant erhöht (vgl. Silvia G. Correa et al., in: Anti-inflammatory effect of gangliosides in the rat hindpaw edema test, European Journal of Pharmacology, 199 (1991) 93-98; Amico-Roxas M., et al., in: Anti-inflammatory action of AGF<sub>44</sub>, a ganglioside ester derivative, Drugs Exptl.Clin.Res.XVIII(6) 251-259 (1992); James J. Mond et al., in: Inhibition of LPS-Mediated Cell Activation In Vitro and In Vivo by Gangliosides, Circulatory Shock 44:57-62 (1995). In keiner der Arbeiten werden die beobachteten Effekte mit Wechselwirkungen der verabreichten Ganglioside mit anti-Gangliosid-Antikörpern erklärt. Letztere werden im gegebenen Zusammenhang gar nicht diskutiert.

Dabei kann eine solche Wechselwirkung im Sinne einer Antikörperblockierung die beschriebenen Befunde schlüssig erklären. Die konzeptionellen Grundlagen der vorliegenden Erfindung lassen sich noch wie folgt vertiefen: Es ist davon auszugehen, dass die Sepsispatienten, deren Seren vermessen